Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 415- 426

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۲۶-۴۱۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "*in vitro*"

Hediyeh Yousefipour[1], Mohammad Amin Mehrnia[*2], Behrooz Alizadeh Behbahani[2],

Hossein Jooyandeh[3], Mohammad Hojjati[3]

Received: 2021.09.05
Revised: 2021.10.30
Accepted: 2021.11.13
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Yousefipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Hojjati, M. (2022). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "*in vitro*". *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 415-426.

Abstract

Introduction: Herbs and spices, which are essential part of the human diet, have been used in traditional medicine to increase the flavor, color, and aroma of various foods and food products. Herbs and spices are also known as preservative, antioxidative, and antimicrobial agents. Plant extracts and their components with pathogen-growth suppression effect and little toxicity to host cells could be considered as excellent candidates for developing new antimicrobial agents. *Trigonella foenum*- graceum is an annual herbaceous plant with bright yellow and sometimes purple-white flowers. Therapeutic effects of this plant include analgesia, anti-cancer, and treatment of diabetes by lowering blood sugar and lowering blood lipids. In ancient Egypt, this plant was used to embalm the dead and incense. The seeds of the plant are used to treat leprosy, hemorrhoids, and relieve bronchitis. The seeds of this plant contain various compounds such as vitamins, amino acids, saponins, fatty acids, and flavonoids. The antimicrobial and antioxidant effects of *T. foenum* have been detrmined byvarious studies. This study was therefore aimed to produce the *T. foenum* extract and evaluate its antioxidant and antimicrobial properties.

Materials and methods: Fifty g of powdered plant was added to 250 mL of water and stirred for 72 h. The solution was passed through the Whatman filter paper and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min to discard the suspended solids. Next, a vacuum evaporator was used to remove the excess water and the obtained extract was packed and kept away from light at 4 °C. Total phenol and flavonoid contents were measured by colorimetric methods. The antimicrobial effect of the extract on *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans* was evaluated using disc diffusion agar (DDA), well diffusion agar (WDA), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal /fungicidal concentration (MBC/MFC) methods. Interaction of aqueous extract and Chloramphenicol and Amphotericin B was also evaluated. Antioxidant effect of the extract was determined by ABTS, DPPH, and β-carotene/linoleic acid bleaching assay. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was also used to identify the functional groups.

1. MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding Author Email: Mehrnia@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72348.1092

Results and discussion: Total phenol and flavonoid contents of the extract were 46.60 mg GAE/g and 37.57 mg QE/g, respectively. The aqueous extract also showed antioxidant effects of 60.55, 55.53 and 50.40%, based on DPPH, ABTS methods and β-carotene/linoleic acid assay, respectively. *T. foenum* aqueous extract had the inhibitory effect on all examined microorganisms, at all concentrations (20, 40, 60 and 80 mg/mL). The antibiotic effect of chloramphenicol for *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* and *B. cereus* was 13.30, 14.50, 18 and 19.10 mm, respectively, and the effect of this antibiotic for *C. albicans* was not measured. Also, the antibiotic effect of amphotericin B for *C. albicans* was 15.10 mm. Furthermore, the interaction of *T. foenum* aqueous extract with the antibiotic chloramphenicol presented a synergistic effect on the examined bacteria and led to a significant increase in inhibition zone diameter. Additionally, the interaction of the extract with antibiotics showed a synergistic effect on *C. albicans*. In infrared spectrum, peaks at 3370, 2965, and 1613 cm^{-1} were related to stretching vibration of O-H, C-H, C=C bonds of aromatic ring and aromatic groups of *T. foenum* aqueous extract. In general, the extract of *T. foenum* could be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent in food and pharmaceutical industries.

Keywords: Aqueous extract of *Trigonella foenum*, Antimicrobial properties, Antioxidant properties, Total phenol and flavonoids.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 415- 426

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۲۶-۴۱۵

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی گروه‌های عاملی ترکیبات زیست‌فعال، توانایی رادیکال گیرندگی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی شنبلیله (*Trigonella foenum*) در شرایط برون‌تنی

هدیه یوسفی‌پور[۱]- محمدامین مهرنیا[۲]*- بهروز علیزاده بهبهانی[۲]- حسین جوینده[۳]- محمد حجتی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

امروزه به دلیل اثرات سمی آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی سنتزی تمایل به استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌ها افزایش یافته است. از این‌رو در این پژوهش میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره آبی گیاه شنبلیله، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B بررسی شد. همچنین گروه‌های عاملی عصاره آبی توسط طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه مورد مطالعه قرار گرفت. میزان فنول کل عصاره برابر با ۶۴/۶۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل برابر با ۳۷/۵۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بود. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در ۳ روش مهار رادیکال آزاد ۱ و ۱- دیفنیل- ۲-پیکریل- هیدرازیل، روش مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲-آزینوبیس (۳- اتیل بنزوتیازولین ۶- سلفونیک اسید) و روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید به‌ترتیب برابر با ۶۰/۵۵، ۵۵/۵۳ و ۵۰/۴۰ درصد بود. همچنین مشخص گردید که عصاره آبی گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضدمیکروبی خوبی بوده و برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B اثر سینرژیستی را در برابر میکروارگانیسم‌های *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Candida albicans* نشان داد. ازاین‌رو، عصاره آبی گیاه شنبلیله می تواند یک جایگزین مناسبی برای ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی سنتزی به شمار رود.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی شنبلیله، فعالیت ضدمیکروبی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فنول و فلاونوئید کل.

مقدمه

بیماری‌های عفونی یکی از مهمترین مشکلات جهان به‌شمار می روند که سالیانه منجر به مرگ بیش از ۵۷ میلیون انسان در جهان می‌شود. در سه دهه اخیر، تعدادی آنتی‌بیوتیک جدید در صنعت داروسازی تولید شده که اثرات سمی و مقاومت میکروبی منجر به کاهش اثر بخشی این داروها شده است. از سوی دیگر، گونه‌های فعال اکسیژن که از متابولیسم سلولی تولید می‌شوند بسیار سمی بوده و در نتیجه آسیب به لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها در ایجاد بیماری های مزمن نقش دارند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی در جلوگیری از این امر مؤثر می باشد، اما به دلیل اثرات سمی و سرطان‌زایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی این ترکیبات با انواع طبیعی جایگزین شده‌اند (Akhtar et al., 2018). ادویه‌ها و گیاهان معطر که از مهمترین اجزای رژیم غذایی انسان می‌باشند، از زمان‌های گذشته به‌عنوان داروهای سنتی و ایجاد عطر و طعم و رنگ در مواد غذایی استفاده می‌شوند. علاوه بر عطر و طعم بالا، گیاهان معطر و ادویه‌ها به دلیل خاصیت نگهدارندگی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نیز شناخته شده می‌باشند (Babuskin et al., 2014). عصاره‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها به‌دلیل فعالیت بیولوژیکی متعدد، جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها و اثرات سمی بسیار اندکی که روی سلول‌های میزبان دارند، گزینه‌های مناسبی جهت گسترش داروهای ضدمیکروبی می‌باشند. این مواد در بخش‌های مختلف گیاه

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۴- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: Mehrnia@asnrukh.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72348.1092

مانند دانه، میوه، گل، برگ، ساقه و ریشه یافت می‌شوند و از جمله ترکیبات دارویی آن‌ها می‌توان به آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و فنول‌ها اشاره کرد (Jaberian et al., 2013). در مطالعات گوناگون اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است (Alizadeh Behbahani et al., 2012؛ Yeganegi et al., 2018؛ Chen et al., 2008؛ Kukić et al., 2008).

نام گیاه شنبلیله یا شنبلید (*Trigonella foenum*- graceum) از کلمه یونانی Trigonella به دلیل سه گوشه بودن شکل برگچه‌ها و foenum- graceum به معنای علف یونانی (Greek hay) به دلیل کاربردهای آن در دوره یونان باستان گرفته شده است. شنبلیله یک گیاه علفی، یک ساله با گل‌هایی به رنگ زرد روشن و گاهی بنفش مایل به سفید بوده که طول آن تا ۵۰ سانتی‌متر می‌رسد. این گیاه در مناطق مختلف از جمله مصر، چین، مراکش، هند، اسپانیا و ایتالیا کشت می‌شود. بیش از ۱۰۰ نوع گونه زراعی و وحشی این گیاه در دنیا شناخته شده است که گزارش شده است بیش از ۳۲ گونه آن در بخش‌های مختلف ایران مانند خراسان، آذربایجان، دامغان، مناطق مرکزی، فارس و اصفهان پراکنده می‌باشد (Hasanzadeh et al., 2010). از اثرات درمانی این گیاه می‌توان به ضددرد، ضدسرطان، درمان دیابت و کاهش قند خون و کاهش چربی خون اشاره کرد. در مصر قدیم از این گیاه برای مومیایی کردن مردگان و بخور استفاده می‌شده است. از دانه‌های گیاه جهت معالجه جذام، معالجه بواسیر، رفع التهاب نایژه‌ها و برطرف کردن بوی بد دهان استفاده می‌شود (Modaresi and Mahdian, 2012). دانه‌های این گیاه حاوی ترکیبات مختلفی مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، ساپونین‌ها، اسیدهای چرب و فلاونوئیدها می‌باشد (Arbab et al., 2020). در پژوهش‌های مختلف اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی گیاه شنبلیله مطالعه شده است. Wagh و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه شنبلیله بر روی میکروارگانیسم‌های *Aspergillus niger*، *Aspergillus fumigatus*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* را بررسی کردند (Wagh et al., 2007). Akbari و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که روغن دانه شنبلیله دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد و می‌تواند در داروسازی مورد استفاده قرار گیرد (Akbari et al., 2019). با توجه به خواص درمانی و ویژگی‌های بیولوژیکی گیاه شنبلیله، هدف از این پژوهش بررسی میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره این گیاه و مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن بر *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Candida albicans* و بررسی گروه‌های عاملی موجود در آن بود.

مواد و روش‌ها

محلول تری‌فنل‌تترازولیوم کلراید، دیسک‌های بلانک، آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B، محیط‌های سابروز دکستروز آگار، سابروز دکستروز براث، مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث از شرکت مرک (آلمان) و بتاکاروتن، لینولئیک اسید، ABTS[1]، DPPH[2] و معرف فولین- سیوکالچو از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. در این پژوهش از سویه‌های *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Candida albicans* نگهداری شده در کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد.

تهیه عصاره آبی گیاه شنبلیله

پس از خشک کردن و پودر کردن گیاه، از روش خیساندن جهت تهیه عصاره آبی آن استفاده شد. طبق این روش، ۵۰ گرم از گیاه پودر شده به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مجهز به سیستم لرزان هم زده شد. پس از عبور محلول از کاغذ صافی واتمن جهت حذف ترکیبات معلق موجود به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد با استفاده از اواپراتور تحت خلأ آب اضافی حذف و عصاره به‌دست آمده دور از نور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (Tabatabai Yazdi et al., 2016).

اندازه‌گیری میزان فنول کل

از معرف فولین- سیوکالچو جهت اندازه‌گیری فنول کل عصاره آبی شنبلیله استفاده شد. بدین ترتیب که، ۱ میکرولیتر عصاره به ۲/۵ میلی لیتر محلول فنول اضافه شد. نمونه به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات (۷ درصد) به آن اضافه و پس از گذشت ۶۰ دقیقه، جذب آن در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. از گالیک اسید جهت تهیه نمودار استاندارد استفاده شد. مقدار فنول کل بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره (mg GAE/g) گزارش گردید (Majdi et al., 2021).

---

1 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

2 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

به‌منظور تعیین فلاونوئید کل عصاره آبی گیاه شنبلیله، ۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر عصاره یا ۰/۵- صفر میلی‌گرم در میلی‌لیتر کوئرستین با ۰/۳ میلی‌لیتر محلول نیتریت سدیم (۵ درصد) مخلوط شد. در مرحله بعد محلول به مدت ۵ دقیقه همزده شد. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر آلومینیوم تری کلراید ۱۰ درصد وزنی/ حجمی به آن اضافه و مجدداً ۶ دقیقه همزده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر سود ۱ مولار به آن‌ها اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان فلاونوئید کل بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره (mg QE/g) گزارش گردید (Barzegar et al., 2020).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS و روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شنبلیله استفاده شد.

اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

در این روش ۳/۹ میلی‌لیتر محلول استوک DPPH (۰/۰۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره اضافه و به خوبی مخلوط گردید. پس از نگهداری محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب آن در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Behbahani et al., 2018):

$$\% \text{ Scavenging activity} = [(Abs_{control} - Abs_{sample})] / (Abs_{control}) \times 100 \quad (۱)$$

$Abs_{control}$؛ جذب DPPH به همراه متانول و Abs_{sample}؛ جذب رادیکال DPPH به همراه نمونه.

روش مهار رادیکال آزاد ABTS

ابتدا محلول ABTS و پتاسیم پرسولفات به‌منظور تولید رادیکال های آزاد ABTS با یکدیگر مخلوط شدند. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره به محلول رادیکالی ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) اضافه و جذب نمونه در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS عصاره طبق فرمول زیر محاسبه شد (Alizadeh Behbahani et al., 2021):

$$ABTS - RS\ activity\ (\%) = \frac{A\ control - A\ sample}{A\ control} \quad (۲)$$

روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید

روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید بر اساس جلوگیری از اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن از طریق رادیکال های آزاد می‌باشد که هیدروپراکسیدهای کنژوگه و ترکیبات فرار را تولید می‌کنند. رنگ‌بری بتاکاروتن با استفاده از رادیکال‌های آزاد می‌باشد که توانایی تولید ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کنژوگه را دارا هستند. به‌طور خلاصه درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Behbahani et al., 2019):

$$\text{Inhibitory percentage } (\%) = [(A_{A120} - A_{C120}) / (A_{C0} - A_{C120})] \times 100 \quad (۳)$$

که A_{A120} جذب عصاره بعد از ۱۲۰ دقیقه، و A_{C120} و A_{C0} به ترتیب جذب نمونه کنترل در زمان صفر و بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی عصاره

روش‌های نفوذ در دیسک آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی جهت بررسی قدرت ضدمیکروبی شنبلیله مورد استفاده قرار گرفت.

نفوذ در دیسک آگار

غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) تهیه و توسط فیلترهای ۴۵ میکرومتر استریل گردید. سپس دیسک‌های بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در غلظت‌های مختلف عصاره نگهداری شدند. سپس دیسک روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری‌ها و سابروز دکستروز حاوی قارچ تثبیت شدند. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد (Barzegar et al., 2020).

چاهک آگار

پس از کشت سطحی باکتری‌ها و قارچ روی محیط‌های مولر هینتون آگار و سابروز دکستروز آگار و ایجاد چاهک‌ها در هر پلیت، غلظت‌های مختلف عصاره در هر چاهک ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گرد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Behbahani et al., 2018).

حداقل غلظت مهارکنندگی

عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر DMSO[1] مخلوط و محلول به ۹/۵ میلی لیتر مولر هینتون براث برای باکتری‌ها و سابروز دکستروز برای قارچ اضافه شد. سپس رقت‌های متوالی (۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از محلول با افزودن ۵ میلی‌لیتر غلظت قبلی به مقدار مساوی از هر یک از محیط‌های کشت تهیه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به همراه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی و قارچ به همراه کنترل مثبت و منفی به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ، معرف تری فنل تترازولیوم کلراید (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد. کمترین غلظتی از عصاره که رشد میکروبی جلوگیری کرده و هیچگونه تغییر رنگی در آن غلظت مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Yeganegi et al., 2018).

حداقل غلظت کشندگی

در این روش که در ادامه روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی انجام می‌شود، از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابروز دکستروز برای قارچ کشت داده شد. پلیت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های حاوی قارچ به مدت ۷۲ پلیت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. اولین غلظت فاقد هیچگونه رشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Barzegar et al., 2019).

ارزیابی برهمکنش (هم‌افزایی و کاهندگی) عصاره در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B

از روش انتشار دیسک به‌منظور ارزیابی برهمکنش عصاره آبی شنبلیله با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه استفاده شد. جهت ارزیابی اثر هم‌افزایی و کاهندگی عصاره بر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) که معمولاً ۱/۲ و ۱/۴ حداقل غلظت مهارکنندگی بوده استفاده می‌شود. غلظت تحت مهاری (حداقل غلظت مهارکنندگی) عصاره به محیط‌های مولر هینتون آگار و سابروز دکستروز آگار اضافه و باکتری‌ها و قارچ روی محیط‌های مربوطه به صورت چمنی با استفاده از سوآپ کشت داده شدند. در مرحله بعد دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی محیط آگار قرار داده شدند و گرمخانه‌گذاری پلیت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های حاوی قارچ به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتها، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Barzegar et al., 2020).

طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

جهت شناسایی کیفی و تعیین گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی عصاره از آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه استفاده شد. ابتدا پودر عصاره با پتاسیم برمید مخلوط و سپس فشرده شد. طیف FTIR عصاره توسط دستگاه FTIR در طول‌موج cm^{-1} ۵۰۰–۴۰۰۰ ثبت گردید (Sosani Gharibvand et al., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

هر یک از آزمون‌های این پژوهش در ۳ تکرار انجام و نتایج به صورت "انحراف معیار ±میانگین" گزارش و نتایج به‌دست آمده با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵) انجام شد.

نتایج و بحث

ترکیبات فنولی مختلفی در گیاهان وجود دارد و فلاونوئیدها از جمله مشتقات این ترکیبات می‌باشند که در بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارند. گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار ترکیبات فنولی به‌عنوان دهنده هیدروژن موجب کنترل عوامل اکسید کننده و ازاین‌رو جلوگیری از اکسیداسیون می‌شوند (Mehrnia et al., 2021). همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان فنول کل عصاره آبی شنبلیله برابر با ۶۴/۶۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل آن برابر با ۳۷/۵۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره می‌باشد. نتایج هر یک از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شده برای عصاره آبی شنبلیله در جدول ۱ گزارش شده است که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای این عصاره می‌باشد. Norziah و همکاران (۲۰۱۵) میزان فنول کل عصاره‌های تهیه شده از آب و آب داغ دانه شنبلیله را به‌ترتیب ۱۹/۳۱ و ۲۵/۶۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره، میزان فلاونوئید کل این عصاره‌ها را به‌ترتیب ۳/۷۶ و ۷/۳۰ میلی‌گرم کاتچین در گرم عصاره گزارش کردند. این پژوهشگران فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این عصاره‌ها را به ترکیبات فنولی موجود در آن‌ها نسبت دادند (Norziah

1 Dimethyl sulfoxide

et al., 2015). در مطالعه دیگری میزان فنول کل عصاره اتانولی برگ تازه، برگ بالغ و دانه شنبلیله به‌ترتیب ۵۴/۷۹، ۴۱/۲۸ و ۲۳/۸۵ گرم گالیک اسید در کیلوگرم وزن خشک گزارش شده است. همچنین وجود ترکیبات فنولی به بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی در هر یک از عصاره‌ها نسبت داده شده است (Singh et al., 2014). جهت درک مکانیسم دارویی گیاه شنبلیله خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی آن مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد مانند اسید آسکوربیک، BHT[1]، آلفا توکوفرول، زردچوبه، کوئرستین و ترولوکس با استفاده از روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. عصاره در تمامی روش‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان داد. در این پژوهش میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره به ترتیب ۴۰ میلی‌گرم پیروکاتکول در گرم عصاره و ۸۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شده است (Subhashini et al., 2011). تفاوت در میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به عوامل مختلفی مانند روش‌های استخراج، اختلاف سن گونه، شرایط آب و هوایی، نوع خاک، زمان جمع‌آوری گیاه و محل رشد آن وابسته می‌باشد (Ansari pour et al., 2019).

جدول ۱- میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شنبلیله

Table 1- Total phenol, flavonoid and antioxidant activity of aqueous extract of Trigonella foenum

Antioxidant activity (%)				
β-carotene/linoleic acid bleaching	ABTS	DPPH	Total flavonoid (mg QE/g)	Total phenol(mg GAE/G)
50.40± 0.64	55.53± 0.50	60.55± 0.78	37.57± 0.39	64.60± 0.51

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن آگار) عصاره آبی شنبلیله بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر

Table 2- Mean inhibition zone (mm) of aqueous extract of Trigonella foenum on pathogenic bacteria (disk diffusion agar)

Concentration (mg/ml)				
80	60	40	20	Microorganism
13.40± 0.28[d]	10.80± 0.32[c]	8.90± 0.25[b]	7.10± 0.18[a]	***E. coli***
12.50± 0.35[c]	10.00± 0.30[b]	8.00± 0.65[a]	7.00± 0.40[a]	***E. aerogenes***
16.30± 0.42[d]	13.50± 0.23[c]	10.80± 0.29[b]	8.40± 0.28[a]	***S. aureus***
15.00± 0.37[d]	11.80± 0.20[c]	9.90± 4.40[b]	7.60± 0.38[a]	***B. cereus***
15.50± 0.44[d]	13.30± 0.29[c]	10.60± 0.36[b]	8.50± 0.15[a]	***C. albicans***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شنبلیله است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

میانگین قطر هاله عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن در جدول ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که برای هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه با افزایش غلظت عصاره آبی خاصیت ضد میکروبی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، درحالی‌که غلظت‌های یکسان در میکروارگانیسم‌های مختلف فاقد اثر معنی‌داری می‌باشند. در این روش کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *E. aerogenes* مشاهده شد که بیانگر مقاومت بالای این باکتری به عصاره آبی شنبلیله و تأثیر کم عصاره بر این باکتری می‌باشد و بیشترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در باکتری *S. aureus* نشان از حساسیت این باکتری به عصاره آبی شنبلیله می‌باشد. میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار (جدول ۳) نشان می‌دهد که افزایش غلظت عصاره آبی در تمامی میکروارگانیسم‌ها منجر به افزایش قطر هاله عدم رشد می‌شود که این افزایش در تمامی میکروارگانیسم‌ها به جز باکتری *E. aerogenes* معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). در باکتری *E. aerogenes* در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید در حالی‌که در سایر غلظت‌ها میزان قطر هاله‌های عدم رشد دارای اختلاف معنی‌داری بودند. همچنین غلظت های یکسان به‌جز غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد اثر معنی‌داری در میکروارگانیسم‌های مختلف بود. در این غلظت‌ها (۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قطر هاله عدم رشد باکتری *E. aerogenes* اختلاف معنی‌داری را با سایر میکروارگانیسم‌ها نشان داد. به‌طور کلی در این روش نیز کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری

1Butylated hydroxyl toluene

E. aerogenes و بیشترین مقدار آن در باکتری *S. aureus* مشاهده گردید. مقایسه نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار نشان می‌دهد که اثر ضدمیکروبی عصاره آبی شنبلیله در روش چاهک آگار بیشتر بوده که این امر به دلیل تماس مستقیم عصاره با میکروارگانیسم ها در روش چاهک آگار می‌باشد. درحالی‌که در روش دیسک دیفیوژن عصاره پس از انتشار دیسک اثر خود را نشان می‌دهد (Alizadeh Behbahani et al., 2021).

جدول۳- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره آبی شنبلیله بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر

Table 3- Mean inhibition zone (mm) of aqueous extract of *Trigonella foenum* on pathogenic bacteria (well diffusion agar)

Concentration (mg/ml)				
80	**60**	**40**	**20**	**Microorganism**
14.50± 0.34[d]	12.00± 0.15[c]	9.90± 0.28[b]	7.60± 0.24[a]	***E. coli***
13.20± 0.41[c]	10.10± 0.48[b]	9.50± 0.33[b]	7.50± 0.28[a]	***E. aerogenes***
17.50± 0.38[d]	14.60± 0.46[c]	12.00± 0.54[b]	9.60± 0.31[a]	***S. aureus***
16.20± 0.27[d]	13.50± 0.43[c]	10.80± 0.39[b]	8.00± 0.47[a]	***B. cereus***
17.00± 0.56[d]	14.20± 0.31[c]	11.00± 0.44[b]	8.60± 0.50[a]	***C. albicans***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند .

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شنبلیله است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.
Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

جدول ٤- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی شنبلیله بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

Table 4- Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of aqueous extract of *Trigonella foenum* on pathogenic microorganisms

MBC/MFC[2] (mg/ml)	**MIC (mg/ml)[1]**	**Microorganism**
512	32	***E. coli***
>512	64	***E. aerogenes***
256	8	***S. aureus***
256	8	***B. cereus***
256	8	***C. albicans***

در جدول ۴ حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی عصاره آبی شنبلیله را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج، کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی مربوط به *S.aureus*، *Bacillus cereus* و *C. albicans* و بیشترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی مربوط به *E. aerogenes* می‌باشد.

نتایج حاصل از اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B و برهمکنش آن‌ها با عصاره آبی شنبلیله در جدول ۵ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که اثر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری های *E. coli*، *E. aerogenes*، *S. aureus* و *B. cereus* به‌ترتیب ۱۳/۳۰، ۱۴/۵۰، ۱۸ و ۱۹/۱۰ میلی‌متر بوده و اثر این آنتی‌بیوتیک برای سویه قارچی *C. albicans* انجام نشد. همچنین اثر آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B برای *C. albicans* برابر با ۱۵/۱۰ میلی‌متر می‌باشد. در حالی‌که اثر این آنتی‌بیوتیک برای باکتری‌های مورد مطالعه انجام نشد. همچنین مشخص می‌شود که برهمکنش عصاره آبی با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل دارای اثر سینرژیستی برای باکتری‌ها بوده و سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها می‌شود. در رابطه با قارچ *C. albicans* برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک دارای اثر سینرژیستی بوده منجر می‌شود که قطر هاله عدم رشد به ۲۰/۲۰ میلی‌متر به‌طور معنی‌داری افزایش یابد.

اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با استفاده از روش‌های مختلف در مطالعات گوناگون بررسی شده است (Alizadeh Behbahani et al., 2012؛ Yazdi et al 2013؛ Behbahani et al., 2012). در رابطه با خاصیت ضدمیکروبی بخش‌های مختلف گیاه شنبلیله نیز مطالعاتی صورت گرفته است. به‌عنوان مثال در بررسی اثر عصاره‌های اتانولی و آبی دانه شنبلیله بر میزان رشد *S. aureus* تلقیح شده در فیله کپور مشخص گردید که تعداد این باکتری‌ها با گذشت زمان در نمونه‌های شاهد افزایش و در نمونه‌های حاوی عصاره کاهش

1 Minimum inhibitory concentration
2 Minimum bactericidal/fungicidal concentration

می‌یابد و غلظت ۴ درصد عصاره‌های اتانولی و آبی منجر به توقف رشد باکتری در روزهای ۹ و ۱۲ دوره نگهداری شد (Arbab et al., 2020). اثر ضدمیکروبی روغن دانه این گیاه بر روی *Salmonella* ،*S. aureus* *typhimurium*، *E. coli* و *A. niger* نشان داد که روغن این گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی قابل توجهی در برابر تمامی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه می‌باشد و بیشترین خاصیت ضدمیکروبی در *E. coli* و *A. niger* مشاهده شد (Sulieman et al., 2018). همچنین گزارش شده است که عصاره‌های آبی، استونی و متانولی تهیه شده از برگ، دانه و ساقه گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضدمیکروبی در برابر باکتری‌های *E. coli* و *Staphylococcus* می‌باشد و در بین عصاره‌های مختلف بیشترین خاصیت در عصاره متانولی مشاهده شد (Sharma et al., 2016). اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ‌های تازه و رسیده و دانه گیاه شنبلیله با روش دیسک دیفیوژن بررسی و گزارش گردید که برگ‌های رسیده در مقایسه با نوع دیگر دارای خاصیت ضدمیکروبی بیشتری در برابر باکتری *B. cereus* می‌باشد (Singh et al., 2014). Haque و همکاران (۲۰۱۵) خاصیت ضدمیکروبی اسانس دانه شنبلیله در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند. مطالعات نشان می‌دهد که خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات زیست فعالی است که به سطح سلول متصل شده و سپس به لایه‌های فسفولیپیدی غشای سلولی وارد می‌شود (Haque et al., 2015). این امر منجر به اختلال در یکپارچگی ساختار غشا و در نهایت مرگ سلول می‌شود. از سوی دیگر حساسیت باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه به باکتری‌های گرم منفی به عصاره آبی گیاه شنبلیله می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار غشایی این باکتری‌ها باشد. به‌گونه‌ای که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی بسیار مستحکم، پیچیده و حاوی مقادیر زیادی لیپوپلی‌ساکارید بوده که منجر به عبور مقادیر محدودی از ترکیبات می‌شود. درحالی‌که باکتری‌های گرم مثبت فاقد غشای پیچیده می‌باشند و توسط دیواره پپتیدوگلیکان غیر متراکم احاطه شدند در نتیجه ترکیبات ضدمیکروبی به‌راحتی به غشا سلولی دسترسی خواهند داشت (Shahidi et al., 2019).

جدول ۵- اثر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B و برهمکنش آن‌ها با عصاره آبی شنبلیله

Table 5- Antimicrobial effect of chloramphenicol and amphotericin B and their interaction with aqueous extract of *Trigonella foenum*

Antimicrobial agent				Microorganism
Amphotericin B+ Extract	Chloramphenicol+ Extract	Amphotericin B	Chloramphenicol	
Not done	19.220± 0.55[b]	Not done	13.30± 0.50[a]	***E. coli***
Not done	19.00± 0.47[b]	Not done	14.50± 0.44[a]	***E. aerogenes***
Not done	25.60± 0.62[b]	Not done	18.00± 0.34[a]	***S. aureus***
Not done	20.90± 0.46[b]	Not done	19.10± 0.30[a]	***B. cereus***
20.20± 0.41[b]	Not done	15.10± 0.43[a]	Not done	***C. albicans***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند.

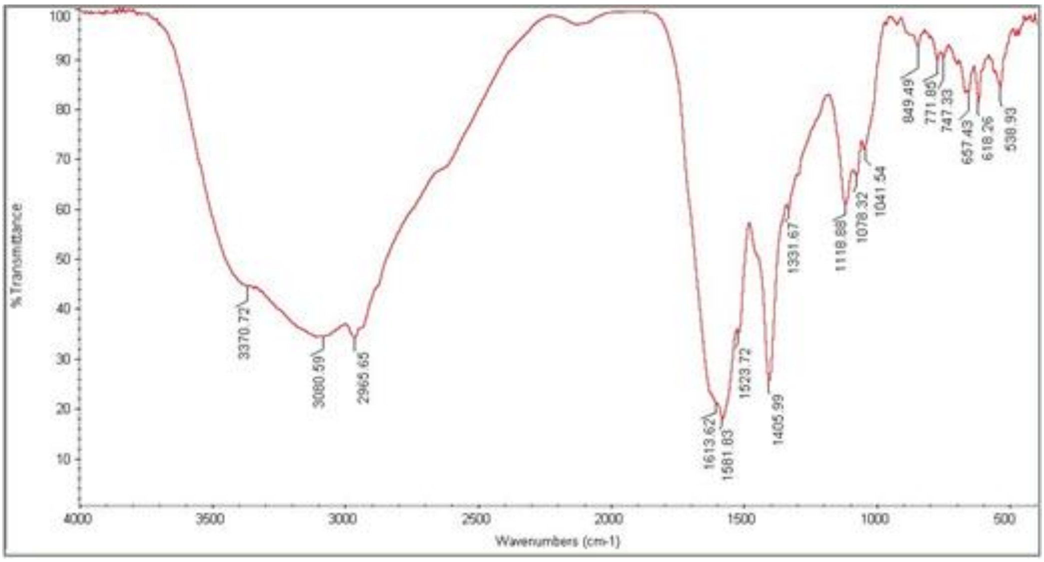
حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شنبلیله است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

عصاره‌های گیاهی از سیستم‌های پیچیده‌ای تشکیل شده‌اند. طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه جهت شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره آبی شنبلیله استفاده شد (شکل ۱). در این شکل پیک پهن به مرکزیت cm^{-1} ۳۳۷۰ به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و عدد موجی cm^{-1} ۲۹۶۵ به دلیل پیوندهای C-H می‌باشد (Sosani Gharibvand et al., 2020؛ Alizadeh Behbahani et al., 2020). همچنین عدد موجی cm^{-1} ۱۶۱۳ می‌تواند به دلیل گروه های C=C در حلقه‌های آروماتیک، عدد موجی cm^{-1} ۱۵۰۷ به دلیل ارتعاش در آمین‌ها و عدد موجی cm^{-1} ۱۴۰۵ به دلیل ژمینال متیل[1] باشد (Vidhu et al., 2014). علاوه بر این عدد موجی cm^{-1} ۱۴۰۵ و cm^{-1} ۱۳۳۱ به دلیل پیوند خمشی C-H نشان‌دهنده آلکان، عدد موجی cm^{-1} ۱۱۱۸ و cm^{-1} ۱۰۷۸ به دلیل پیوند کششی C-O نشان‌دهنده الکل نوع دوم، عدد موجی cm^{-1} ۱۰۴۱ به دلیل پیوند کششی S=O نشان‌دهنده سولفوکسید، عدد موجی cm^{-1} ۸۴۹ به دلیل پیوند خمشی C-H نشان‌دهنده استخلاف ۱و ۲و ۳ و عدد موجی cm^{-1} ۷۴۷ به دلیل پیوند خمشی C=C نشان‌دهنده الکل می‌باشد (Namazi et al., 2021).

1 Geminal methyl



شکل ۱- طیف FTIR عصاره آبی گیاه شنبلیله.

Fig. 1. FTIR spectrum of aqueous extract of Trigonall foenum.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمون‌های ضدمیکروبی نشان داد که عصاره آبی گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضدمیکروبی بالایی در برابر انواع میکروارگانیسم‌ها (باکتری گرم مثبت، گرم منفی و قارچ) بوده و فعالیت ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر می‌باشد. همچنین مشخص گردید که قطر هاله‌های عدم رشد در برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد بنابراین ترکیب عصاره با آنتی‌بیوتیک در بروز خاصیت ضدمیکروبی بیشتر مؤثر می‌باشد. وجود ترکیبات فنولی سبب بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در عصاره آبی گیاه شنبلیله شد. از این‌رو می‌توان از این گیاه به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی در صنعت غذا و دارو استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Alara, O. R., & Abayomi, O. O. (2019). Extraction, characterization and antioxidant activity of fenugreek (*Trigonella-foenum graecum*) seed oil. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(2), 349-355. https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.12.001
2. Akhtar, N., & Mirza, B. (2018). Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian journal of chemistry*, 11(8), 1223-1235. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.01.013
3. Alizadeh behbahani, B., & Shahidi, F. (2021). Evaluation of the antimicrobial effect of *Carum copticum* essential oil on some standard microbial strains, indices of infection and food poisoning: an in vitro study. FSCT, 18 (111), 37-44.
4. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2020.
5. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467.
6. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M. (2012). Antimicrobial activity of Avicennia marina extracts ethanol, methanol & glycerin against *Penicillium digitatum* (citrus green mold). *Scientific Journal of Microbiology*, 1(7), 147-151.

7. Ansari pour, A., Mehrnia, M. A., Noshad, M., Barzegar, H., & Alizadeh behbahani, B. (2019). Antimicrobial effect of garlic essential oil on a number of food-borne pathogens and determination of its chemical composition and antioxidant potential. *FSCT*, 16 (91), 17-29.
8. Arbab, M., Alizadeh, E., & Shahriari Moghadam, M. (2020). Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Trigonella foenum-graecum* seed on the quality of *Cyprinus carpio* fillet inoculated with Staphylococcus aureus. *Journal of Food Researc*h, 29(4), 29-43.
9. Babuskin, S., Babu, P. A. S., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M., & Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International journal of food microbiology*, 171, 32-40. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011
10. Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2019). Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *FSCT*, 16(90), 113-125
11. Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* aqueous extract against some gram- positive and gram-negative bacteria. FSCT, 18 (116), 327-335.
12. Barzegar, H., Behbahani, B. A., & Mehrnia, M. A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing Heracleum lasiopetalum essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 717-728. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4
13. Barzegar, H., Mehrnia, M. A. & Behbahani, B. A. (2019). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Journal of Applied Microbiology in food industry*, 4(4), pp.15-28.
14. Behbahani, B. A., & Fooladi, A. A. I. (2018). Antibacterial activities, phytochemical analysis and chemical composition Makhlaseh extracts against the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 114, 204-208. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.002
15. Behbahani, B. A., & Fooladi, A. A. I. (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, 114, 299-303. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
16. Behbahani, B. A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, 136, 103716. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716
17. Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A., & Alghooneh, A. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 114, 225-232. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.004
18. Chen, I. N., Chang, C. C., Ng, C. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., & Chang, T. L. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. *Plant foods for human Nutrition*, 63(1), 15-20. https://doi.org/10.1007/s11130-007-0063-7
19. Haque, A., Khatun, R., & Yaakob, Z. (2015). Gas chromatography mass spectrometry analysis and in vitro antibacterial activity of essential oil from *Trigonella foenum-graecum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1033-1036. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.010
20. Hasanzadeh, E., Rezazadeh, S., Shamsa, S., Dolatabadi, R., Zarringhalam J. (2010). Review on phytochemistry and Therapeutic properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). *J. Med. Plants*, 9(34), 1-18.
21. Jaberian, H., Piri, K., & Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food chemistry*, 136(1), 237-244. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.084
22. Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., & Soković, M. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food chemistry*, 107(2), 861-868. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.005
23. Majdi, B., Mehrnia, M. A., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 17(2), 261-271.
24. Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Barzegar H, & Tanavar, H. (2021). *Sclerorhachis platyrachis* essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria “in vitro”. *FSCT*, 18 (112), 189-198.

25. Modaresi, M., Mahdian, B. (2012). The effect of hydro-alcohol extract of *Trigonella foenum- graceum* L. on reproductive system in Balb/c. *Journal of Medicinal Herbs*, "J. Med Herb" (Formerly known as Journal of Herbal Drugs or J. Herb Drug), 2(4), 261-267.
26. Namazi, P., Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2021). Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts. *FSCT*, 18 (113), 301-311.
27. Norziah, M. H., Fezea, F. A., Bhat, R., & Ahmad, M. (2015). Effect of extraction solvents on antioxidant and antimicrobial properties of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.). *International Food Research Journal*, 22(3), 1261.
28. Shahidi, F., Yazdi F, T., Roshanak, S., Behbahani, B.A., Norouzi, N. & Vasiee, A. (2019). Antimicrobial Activity of *Lepidium draba* Extract on some Pathogenic Microorganisms “in vitro”. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 24(85), pp.1-9.
29. Sharma, V., Singh, P., & Rani, A. (2016). Antimicrobial activity of *Trigonella foenumgraecum* L. Fenugreek). Eur Exp Biol, 7(1).
30. Singh, P., Vishwakarma, S. P., & Singh, R. L. (2014). Antioxidant, oxidative DNA damage protective and antimicrobial activities of the plant *Trigonella foenum-graecum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2497-2504. https://doi.org/10.1002/jsfa.6585
31. Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh H. (2020). Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of Callistemon Citrinus Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study. JRUMS, 19(5), 463-484
32. Subhashini, N., Thangathirupathi, A., & Lavanya, N. (2011). Antioxidant activity of Trigonella foenum graecum using various in vitro and ex vivo models. Int J pharm pharm Sci, 3(2), 96-102.
33. Sulieman, A. M. E., Ahmed, H. E., & Abdelrahim, A. M. (2008). The chemical composition of fenugreek (*Trigonella foenum graceum* L) and the antimicrobial properties of its seed oil. *Gezira J. of Eng & Applied Sci*, 3(2), 52-71.
34. Tabatabai Yazdi, F., Ali Zadeh Behbahani, B., Alghoneh, A., & Zanganeh, H. (2016). Optimization of extraction of Mespilus germanica by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms “in vitro”. *FSCT*, 13(52), 131-145.
35. Vidhu, V. K., & Philip, D. (2014). Catalytic degradation of organic dyes using biosynthesized silver nanoparticles. Micron, 56, 54-62. https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.10.006
36. Wagh, P., Rai, M., Deshmukh, S. K., & Durate, M. C. T. (2007). Bio-activity of oils of Trigonella foenum-graecum and Pongamia pinnata. *African journal of Biotechnology*, 6(13).
37. Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”. *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4).
38. Yeganegi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Asili, J., Behbahani, B. A., & Beigbabaei, A. (2018). Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 116, 62-67. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.014